

De la présence d'anticorps dans les hématies

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Mohammed-Vali GHAHREMAN

de
MECHED (IRAN)

THÈSE N° 2399

GENÈVE
COOPÉRATIVE D'IMPRIMERIE
1956

De la présence d'anticorps dans les hématies

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Mohammed-Vali GHAHREMAN

de

MECHED (IRAN)

THÈSE N° 2399



GENÈVE
COOPÉRATIVE D'IMPRIMERIE
1956

La Faculté de Médecine, sur le préavis de Monsieur le Docteur Roger Fischer, chargé de cours, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là, émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 septembre 1956.

Le Doyen : Eric MARTIN.

(Thèse N° 2399.)

A ma grand'mère.

A mon épouse.

Ce travail a été exécuté sous la direction de Monsieur le Docteur Roger FISCHER, chargé de Cours à l'Université de Genève, Directeur du Centre de Transfusion Sanguine de l'Hôpital Cantonal de Genève.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre profonde gratitude pour l'aide précieuse dont il n'a jamais cessé de nous faire bénéficier.

Nos remerciements vont également à tout le personnel du Centre, tout particulièrement à M^{lle} J. Romieux, chef de laboratoire, et MM. Jean Hochstaetter, assistant, et Jean Monnier, chimiste du Centre, pour leur aimable collaboration.

AVANT-PROPOS

Il est connu que la transfusion d'un sang A à une personne du groupe B par exemple produit, *in vivo*, une hémolyse et un choc dans la plupart des cas, et dans les conditions ordinaires d'une transfusion courante c'est le plasma du receveur qui serait le responsable de cette hémolyse en détruisant les globules rouges du donneur.

En septembre 1953, lors d'un stage au Centre de transfusion sanguine de Genève nous nous sommes posé cette question : Qu'arriverait-il si on lave plusieurs fois deux sangs incompatibles de façon à enlever complètement leur plasma, et que l'on mette en présence les hématies de ces deux groupes, débarrassées de leur anticorps sériques ?

Nous avons ainsi procédé et nous avons obtenu à notre surprise une hémolyse.

Pensant que cela pourrait être un problème intéressant, nous l'avons choisi comme sujet de ce travail.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Nous nous permettrons de rappeler ici quelques notions élémentaires sur les groupes sanguins :

Les principaux groupes sanguins dont l'existence est liée à la présence dans le plasma d'anticorps naturels sont ceux du système de Landsteiner. Ce sont les premiers et les plus anciens des groupes connus. Leurs hématies possèdent deux types d'antigènes avec leurs sous-groupes. Ceci a permis de distinguer :

1. — Les groupes A dont les hématies possèdent les antigènes A, ou A_1 ou A_2 .
2. — Les groupes B dont les hématies possèdent les antigènes B, ou B_1 .
3. — Les groupes AB dont les hématies possèdent les antigènes A_1B ou A_2B .
4. — Le groupe O qui ne possède pas ces antigènes.

Les sérums de ces groupes possèdent évidemment les anticorps correspondants :

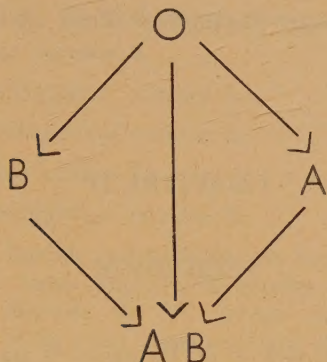
Le groupe A possède l'anticorps anti-B (appelé également alpha).

Le groupe B possède l'anticorps anti-A (ou bêta).

Le groupe AB ne contient pas d'anticorps et c'est pour cette raison qu'il est un receveur universel.

Le groupe O contient par contre les deux anticorps anti-A et anti-B.

Ceci a permis d'établir le schéma de principe bien connu que nous reproduisons ici à titre indicatif qui donne le sens dans lequel les sangs peuvent être transfusés d'un individu à l'autre.



Il va de soi que chacun peut recevoir le sang de son propre groupe sanguin.

Un groupe sanguin est appelé incompatible pour un autre groupe, lorsque le mélange de ces deux sangs, *in vivo* ou *in vitro*, produit au moins une agglutination si ce n'est une hémolyse supplémentaire.

Le mélange *in vivo* de deux sangs incompatibles s'accompagne d'une hémolyse et d'un choc, la plupart du temps, où sont détruites les hématies du donneur, et, souvent aussi, celles du receveur.

Il est connu que les transfusions de sangs incompatibles peuvent avoir des suites dramatiques, quelle que soit la cause de l'incompatibilité et son mécanisme : incompatibilité d'espèce, naturelle ou acquise par immunisation.

La transfusion du sang A à une personne de groupe B aboutit dans un très grand nombre de cas à un choc hémolytique avec hémolyse qui peut être intense et mortelle. On admet que les anticorps présents dans le sang du receveur détruisent les hématies du donneur.

En 1950 déjà, R. Fischer a démontré (journées de Nice, puis Congrès de Lisbonne) que lorsque la transfusion de sangs incompatibles aboutit à des désordres graves et à la mort, on ne peut absolument pas admettre que la simple hémolyse des hématies injectées puisse suffire à expliquer les phénomènes. Elle ne suffit en tout cas pas à expliquer l'intensité de l'hémolyse terminale ; et ainsi, à travers ses expériences, R. Fischer a défini une notion aujourd'hui acceptée

de « l'hémolyse en chaîne »¹ où les hématies sont détruites par une succession de mécanismes : allant de la libération de l'anticorps hémolytique de l'hématie détruite et se reportant sur les hématies saines, à des phénomènes endothéliaux et nerveux centraux : participation de l'hémolyse obtenue par la seule lésion de la région épendymaire cérébrale.

Enfin on peut envisager l'hypothèse d'une agression réciproque des hématies elles-mêmes.

CHAPITRE II

TECHNIQUE

1. — Les sangs de groupe A et B, prélevés par ponction veineuse, sont récoltés séparément sur héparine. Au début, nous avons travaillé avec du sérum physiologique citraté, mais pour pouvoir travailler dans des conditions aussi physiologiques que possible, nous l'avons remplacé par du sérum physiologique hépariné. (Liquémine « Roche » 5000 unités par cm³.)
2. — Première centrifugation à 2000 tours/minute pendant 8 minutes.
3. — Aspiration du plasma surnageant et même de la couche supérieure des hématies, ce qui entraîne au cours des lavages les leucocytes et les thrombocytes.

¹ Voici la théorie de l'hémolyse en chaîne telle que l'explique R. Fischer :

« ...les exemples abondent où de *petites* injections de sang incompatible ont abouti à un état très grave. Lorsque le choc est grave, il est évident qu'il n'est pas proportionnel à la quantité de sang incompatible injecté ; de plus, l'hémolyse finale est elle-même très différente de celle que donnerait la totalité du sang injecté et détruit, elle est nettement plus considérable, il y a hémolyse en chaîne. »

Voici l'expérience qui a permis à R. Fischer d'énoncer son hypothèse :

Il prélève des hématies au lapin, les traite par du sérum chauffé de cobaye anti-lapin, sensibilisées de ce fait et les réinjecte dans les veines du lapin. Il se développe ainsi un choc hémolytique vrai (sans participation massive du sérum hétérologue) aboutissant à la mort de l'animal.

Comme témoin, il prend un deuxième lapin et injecte dans les veines de celui-ci de la même quantité de sang *volontairement* et *préalablement hémolysé*. « L'hémoglobine ainsi libérée est exactement en rapport avec la quantité injectée et répartie dans la masse sanguine du lapin. »

4. — Lavage du culot de centrifugation avec du sérum physiologique hépariné (un flacon de 5,3 cm³ de Liquémine « Roche » suffit pour donner 10 litres du sérum physiologique suffisamment hépariné pour empêcher la coagulation du sang *in vitro*).
5. — Deuxième centrifugation analogue à la première.
6. — Aspiration et rejet du surnageant comme 3.
7. — Deuxième lavage comme 4.
8. — Troisième centrifugation comme 5.
9. — Aspiration du surnageant comme 6.
10. — Troisième lavage comme 7.
11. — Quatrième centrifugation comme 8.
12. — Aspiration. Le liquide surnageant est conservé pour contrôle dans un premier tube (fig. 1) ; la couche supérieure des hématies avec leur liquide de 3^{me} lavage est prélevée dans un deuxième tube. Il ne reste alors au fond du tube que les hématies trois fois lavées.
13. — Mise en contact des hématies A et B ainsi lavées.
14. — Mise à l'étuve des tubes à une température de 37° C pendant 2-4 heures.
15. — Retrait des tubes de l'étuve et examen de ceux-ci qui montre la présence de l'hémolyse dans le tube où les hématies A et B sont mises en contact (fig. 1 et 2).

Les pipettes utilisées pour les manipulations sont minutieusement rincées au sérum physiologique hépariné avant chaque usage.

Le lavage, le rinçage et le séchage de la verrerie ont été l'objet de soins particuliers, de façon à éliminer tous les facteurs hémolysants éventuels pouvant provenir des produits de nettoyage.

CHAPITRE III

Y A-T-IL DES CAUSES D'ERREUR DANS CES EXPERIENCES ?

On pourrait nous objecter que cette hémolyse est due à des causes d'erreur, c'est pourquoi nous essayons de les prévoir et de répondre à ces objections.

Les causes d'erreur pourraient être les suivantes :

- I. — Les centrifugations répétées fragilisent mécaniquement les hématies.
- II. — Elles en diminuent la résistance globulaire.
- III. — Trois lavages successifs ne suffisent pas pour enlever totalement les anticorps sériques, et, cette hémolyse serait due à une persistance des anticorps dans le liquide de troisième lavage qui se trouve entre les hématies.
- IV. — L'hémolyse existait déjà avant la mise à l'étuve des deux sangs mélangés.
- V. — L'hémolyse est due à une autre incompatibilité que celle A,B,O (facteur Rhesus, par exemple).

Voici les réponses expérimentales que nous donnerions à ces objections :

- I. — La centrifugation ne fragilise pas les hématies, parce que nous avons pris deux sangs de même groupe (par exemple les sangs de deux personnes ayant le groupe O) et les avons traités de la même façon que nous avons décrite au début du chapitre précédent et nous n'avons jamais eu d'hémolyse (fig. 7) alors que si les hématies s'étaient fragilisées, une hémolyse aurait dû se produire.
- II. — L'hémolyse n'est pas due à une diminution de résistance globulaire. Voici la preuve :

Pour savoir s'il y a un changement de résistance globulaire, dû aux centrifugations, qui interviendrait comme agent facilitant l'hémolyse, nous avons procédé à un examen de la détermination de résistance globulaire, avant et après les centrifugations :

1. — Nous préparons des solutions de NaCl d'une concentration croissante allant de 2 gr. ‰ jusqu'à 6,4 ‰. Voici la concentration des liquides par ordre croissant :

2	2,4	2,8	3	3,2	3,4	3,6	3,8
4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4
5,6	5,8	6	6,4				

2. — Nous prenons 20 tubes et mettons respectivement dans chacun exactement 2 cm³ de ces liquides.

Nous récoltons dans un tube du sang frais produit d'une ponction veineuse, additionné d'une goutte d'héparine (voir chapitre II).

3. — A l'aide d'un compte-gouttes nous prélevons de ce sang et en mettons une goutte dans chaque éprouvette ; agissons les tubes doucement pour bien mélanger le sang avec le liquide.
4. — Nous prenons le reste du sang hépariné et le lavons trois fois, comme nous l'avons expliqué au début du chapitre précédent.
5. — Nous prenons de nouveau 20 tubes vides et mettons dans chacun, comme la première fois, 2 cm³ des solutions de concentration croissante de NaCl.
6. — Nous prélevons du sang qui vient d'être centrifugé 4 fois, et, à l'aide d'un compte-gouttes, en mettons une goutte dans chaque éprouvette, agissons doucement pour rendre nos solutions homogènes, et mettons les deux séries des tubes dans l'étuve à une température de 37° C.
7. — Après deux heures nous sortons les deux séries des tubes et les centrifugeons une seule fois et à une vitesse ralentie de 2000 tours/min., et pendant également 8 minutes ; et voici le résultat que nous constatons (fig. 3) :
- A. — Dans les tubes série 1 (où nous avons mis du sang non centrifugé) la situation est la suivante :
- a) Dans les quatre premiers tubes, soit les tubes de concentration de 2, 2,4, 2,8, 3 ‰ il s'est produit une forte hémolyse. Elle est si forte qu'on n'observe même pas le stroma des hématies éclatées.
 - b) Les tubes 5 à 8 (concentrations de 3,2 à 3,8 ‰) présentent aussi une hémolyse forte, mais, au fond des tubes on trouve un peu de stroma.
 - c) Les tubes 9 à 12 présentent également une hémolyse, mais qui n'est pas aussi forte, surtout les tubes 11 et 12.
 - d) A partir du 13^{me} tube l'hémolyse a cessé de se produire et les liquides de ces tubes restent clairs.
 - e) Depuis le 9^{me} tube le stroma est nettement visible.

Donc la résistance globulaire minimum du sang en question, avant la centrifugation, a été de 6,4 ‰. (La résistance globulaire d'un sang normal est comprise entre 4,4 - 4,8 ‰.)

B. — Dans les tubes de la série 2, c'est-à-dire où nous avons mis du sang 4 fois centrifugé, la situation est exactement superposable à celle des tubes de la première série. La ressemblance est tellement forte qu'on ne peut pas différencier la 1^{re} série de la deuxième.

Cela veut dire que les quatre centrifugations subies par les hématies n'entraînent aucune diminution de leur résistance globulaire, et, par conséquent ne les rendent pas plus fragiles.

N. B. — Dans la figure N° 3 on constate que l'hémolyse dans le tube 12 est relativement plus forte que celle du tube 11 ; alors que logiquement il devait être le contraire.

Puisque ce phénomène s'est répété dans cette série de tubes il s'agit là d'une intervention des tubes et nous nous en excusons.

III. — Trois lavages successifs suffisent pour débarrasser le sang de ses anticorps sériques.

Voici les preuves :

1. — Nous prélevons le liquide du troisième lavage et en mettons quelques gouttes sur une plaque de marbre, puis nous ajoutons une goutte d'hématies lavées, appartenant à un groupe incompatible avec celui auquel nous venons de faire subir le troisième lavage. (Par exemple si le sang que nous avons lavé appartient au groupe A, nous ajoutons aux quelques gouttes de liquide de troisième lavage de celui-ci, une goutte d'hématies lavées du sang B).

En fait, c'est exactement la même chose que la méthode de Simonin pour déterminer le groupe sanguin.

A la fin de cette expérience nous constatons que ce liquide est incapable d'agglutiner les hématies de groupe opposé.

2. — Nous prélevons le liquide de troisième lavage, et, le mettons en contact des hématies lavées du groupe opposé, pendant 2-4 heures dans l'étuve, et nous ne trouvons pas d'hémolyse (fig. 2, tubes 3 et 4).

3. — Après chaque centrifugation nous prélevons une goutte du liquide surnageant et la déposons sur une bande de papier filtre et, à la fin, nous déposons aussi une goutte de solution physiologique héparinée avec laquelle nous travaillons. Cette goutte nous sert de témoin.

Après avoir séché cette bande à une température ordinaire nous la colorons avec le « bleu de bromo-phénol » qui est un colorant pour les protéines.

Le résultat montre que (fig. 4) le liquide de troisième lavage est aussi pur que le sérum physiologique témoin, qu'il ne donne pas d'image différente, donc pas de révélation de l'existence de protéine.

4. — Pour avoir une sûreté plus grande nous déposons de la même façon une goutte des liquides de chaque lavage et soumettons la bande du papier filtre à l'électrophorèse suivie d'une chromatographie (fig. 5).

Les résultats montrent une absence des protéines dans le liquide de troisième lavage.

Nous tenons à mentionner que s'il restait des traces infinitésimales des protéines dans le liquide du dernier lavage, ce n'est pas avec ce liquide que nous travaillons, car, comme nous l'avons dit, nous aspirons et rejetons ce liquide, en même temps qu'une bonne couche d'hématies immédiatement au-dessous de celui-ci.

5. — La quantité de protéines subsistant dans le liquide qui entoure les hématies après le troisième lavage, peut-elle influencer l'hémolyse ?

L'expérience suivante montre que ce n'est pas le cas : Après 4 à 5 jours de dialyse, pour éliminer aussi parfaitement que possible les sels, 3 cm³ du liquide de troisième lavage sont lyophilisés, puis repris par une goutte d'eau distillée, ce qui représente une concentration d'environ 20 fois. Par colorimétrie, après la coloration à l'Amido schwarz, on peut estimer la teneur en protéines à environ 3 gr./l. En tenant compte des dilutions, cela représente une concentration à l'origine de l'ordre de 0,015 gr./l.

Si nous comparons la teneur en protéines d'un tel liquide avec celle d'un sérum normal (environ 75 gr./l.) nous voyons que le liquide subsistant entre les hématies après le troisième lavage correspond à un sérum normal dilué 5000 fois.

La quantité de protéines contenues dans le liquide qui reste entre les hématies après le troisième lavage est donc pratiquement négligeable.

IV. — L'hémolyse n'existe pas après le troisième lavage et avant la mise à l'étuve des tubes. Car nous prenons le liquide de troisième lavage et là-dessus faisons une réaction de Meyer qui reste négative, prouvant qu'il n'y a non seulement une absence d'hémolyse, mais aussi une absence complète de suspension globulaire.

V. — L'hémolyse n'est pas due à une incompatibilité de facteur Rhesus, car nous avons toujours eu le soin de ne prendre que des sangs Rh +, et pour cette raison nous écartons le rôle du groupe Rh.

Le mélange des sangs du même sous-groupe et Rh— (C. E, c.d.e.) n'a pas donné d'hémolyse.

* * *

Nous nous sommes posé la question de savoir si les deux hématies A et B mises en présence s'hémo lysent toutes deux ou une seule espèce soit la A ou la B ?

Pour pouvoir répondre à cette question nous avons essayé de faire une coloration vitale des hématies d'un seul groupe (par exemple les hématies A) avant de les mélanger aux hématies du groupe incompatible (par exemple du groupe B) et après l'hémolyse faire un frottis et l'étudier au microscope.

Nous avons choisi les colorants vitaux « bleu de Nil » et « le vert Janus » pour cette coloration. En dilutions isotoniques au plasma humain, ces colorants ne sont pas assez forts pour colorer les hématies, et si nous préparons une solution plus concentrée, celle-ci devient hypertonique pour les hématies et les déforme, ce qui pourrait influencer l'hémolyse.

D'autre part, nous avons essayé de mélanger les hématies humaines à des hématies facilement reconnaissables, telles que les hématies d'oiseau (normoblastes). Après l'hémolyse, l'examen d'un frottis du culot devrait permettre de distinguer les hématies touchées par l'hémolyse.

Mais cette expérience n'a pas réussi, car le sérum physiologique convenable pour le lavage des hématies humaines n'est pas isotonique au plasma du poulet, et les globules rouges du poulet éclatent avant le mélange.

Un autre moyen, qui nous paraît très intéressant et comme résultat décisif, est de marquer les hématies humaines par du fer radio-actif.

Voici le procédé que nous envisageons :

Choisir deux personnes ayant le groupe A (que nous appelons Ax et Ay) et deux de groupe B (que nous appelons Bx et By).

Injecter pendant quelques jours du fer radio-actif aux personnes Ax et Bx, de façon que les hématies se chargent du fer radio-actif.

Récolter les sangs de ces quatre personnes séparément et les laver comme nous l'avons expliqué au début de ce travail.

Verser le sang Ax sur By (tube 1), ainsi que le Bx sur Ay, (tube 2).

Si le compteur de Geiger-Muller montre la présence du fer radio-actif dans l'hémolysat du tube 1, cela veut dire que les hématies B ont agi sur les hématies A, qui ont libéré leur hémoglobine radio-active.

Si dans l'hémolysat du tube 2 on trouve également du fer radio-actif, cela prouve que les hématies A ont fait éclater les hématies B.

Par conséquent, si dans l'hémolysat des deux tubes on trouve du fer radio-actif, on peut en conclure que quand on mélange les hématies de deux groupes incompatibles, elles s'hémolisent réciproquement.

Etant donné que l'innocuité de l'essai sur l'homme des substances radio-actives n'est pas encore prouvée, nous nous sommes abstenu de cette expérience et la remettons à un temps ultérieur.

CHAPITRE IV

LE RESULTAT DES MELANGES DES DIFFERENTS GROUPES SANGUINS

1. — Le mélange du sang A et du sang B (toujours lavés trois fois) a donné de l'hémolyse.
2. — Le mélange du O avec A a donné de l'hémolyse.
3. — Le mélange du O avec B a donné de l'hémolyse.
4. — Le mélange du O avec AB a donné de l'hémolyse.
5. — Le mélange de plusieurs groupes O n'a pas donné d'hémolyse.
6. — Le mélange de deux groupes B n'a pas donné, en général, d'hémolyse. Cependant dans quelques cas nous en avons obtenue, ce que nous pensons pouvoir expliquer par l'hétérozygotie probable d'un des sangs (par exemple B.O contre BB).

7. — Le mélange de deux AB, dans lesquels les antigènes A appartiennent à des sous-groupes différents (par exemple A_1B et A_2B) a donné de l'hémolyse.
8. — Le mélange de deux groupes A appartenant à des sous-groupes différents donne de l'hémolyse. Pourtant le mélange des deux groupes A appartenant au même sous-groupe a donné parfois de l'hémolyse, ce qui nous fait penser à l'existence probable d'une hétérozygotie d'un des deux groupes (par exemple A_1A_1 contre A_1O).

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

1. — Le mélange des suspensions d'hématies de groupes différents, en l'absence de leur plasma s'accompagne d'une hémolyse.
2. — Cette hémolyse n'est pas due à une fragilisation des hématies par les centrifugations.
Elle n'est pas due non plus à une diminution de résistance globulaire.
3. — Elle ne paraît pas due à une persistance des anticorps sériques libres.
4. — Le mélange des deux sangs appartenant au même groupe, au même sous-groupe ne donne pas d'hémolyse sauf quelques cas dans lesquels nous avons émis l'hypothèse d'une hétérozygotie probable (voir chapitre IV).
5. — Dans l'hémolysat nous n'avons pas trouvé d'hémoglobine foetale. (Nous l'avons cherchée, en pensant que la présence d'une hémoglobine spéciale pourrait influencer l'hémolyse.)
6. — Pour savoir si dans l'hémolysat on peut trouver de l'histamine (qui expliquerait mieux par sa présence, le phénomène de réaction en chaîne et l'accentuation de l'hémolyse) nous avons fait une chromatographie suivie d'une électrophorèse sur le papier et coloration, d'une goutte d'hémolysat. Comme témoin nous avons pris l'hémolysat produit artificiellement par l'adjonction de l'eau distillée sur la purée globulaire des mêmes sangs, lavés trois fois.

Les résultats montrent une absence de l'histamine aussi bien dans l'hémolysat osmotique que dans l'hémolysat après la mise en présence des hématies incompatibles.

La chromatographie des hémolysats après la dialyse de ceux-ci montre également une absence de l'histamine₁.

* * *

L'hémolyse des hématies reconnaît plusieurs mécanismes.

- A. — Par substance de surface, saponine, Tricalo, etc., donc substances détersives utilisées pour la verrerie et dont nous savons qu'une dilution extrême à 1/60.000 est encore capable d'hémolyser fortement.
- B. — Par des venins.
- C. — Par hémolyse immunologique.

Il n'est absolument pas utile de discuter ici les premières sources d'hémolyse, nous les avons écartées par des réponses expérimentales.

Qu'en est-il de l'hémolyse immunologique ? — Celle-ci nous apparaît comme de première importance dans notre discussion :

Lorsqu'il s'agit de réaction hémolytique immunologique on accuse les hémolysines — dans la plupart des cas il faut la présence du complément frais — évidemment absent de nos expériences — il est donc facile d'exclure cette explication.

- D. — Hémolyse acide dans certains cas agit directement en dehors de la présence de complément, rarement il est vrai.

Nos lavages ont un pH de 6,43, mais en répétant l'expérience avec une eau de lavage à pH de 8,39 (eau bicarbonatée physiologique et hépariné :

CO ₃ HNa	3 gr.
NaCl	7 gr.
eau distillée ad. 1.000 c.c.	
10 gouttes d'héparine)	

nous n'avons aucune différence dans les résultats.

Existe-t-il une différence dans les hémoglobines *elles-mêmes* des hématies ? Nous avons vu que nous n'avons pas d'hémoglobine foetale dans nos expériences.

(¹) Nous remercions Mr. P. Rebeyrotte pour sa précieuse collaboration.

Mais les recherches faites d'autre part au Centre de transfusion sanguine de Genève montrent que l'hémoglobine peut être fractionnée, on le sait, et il reste à savoir si la structure des hématies n'est pas différente à ce point de vue, ne serait-ce que par le fait de l'âge différent des hématies d'un même sang. Encore faut-il admettre que certaines structures permettent cette hémolyse et d'autres pas.

Un peu dans cet ordre d'idées nous avons pu nous assurer que cette hémolyse n'est pas biphasique (encore faut-il rappeler que l'hémolyse dite biphasique demande, elle aussi, le complément). Ces mélanges placés d'abord à 4° C, puis à 37° ne sont pas davantage hémolysés (au contraire !).

Nous savons que cette hémolyse peut fort bien se produire sans complément au niveau de hématies.

R. Fischer en a apporté la preuve suivante :

Il a démontré, déjà en 1950, que les hématies sont capables d'adsorber des protéines ou des virus.

Exemple : il démontre que l'hématie peut devenir le support d'une protéine étrangère antigénique.

En 1949 il absorbe le virus de la coksakie sur les hématies et démontre le fait en dosant l'action inhibitrice de ces hématies sur des sérums de convalescents déjà titrés.

Il s'agit toujours là des hématies *normales* ni papainées ni traitées par un ferment.

Il va jusqu'à écrire qu'on peut trouver là l'explication d'une anémie de convalescence.

Il y a donc là, dit-il, une forme de la possibilité d'une anémie non hémolytique mais immunologique.

Pour nous les expériences de fixation des protéines sur les hématies sont plus intéressantes. Rappelons- en brièvement le schéma : (journées de Nice et Lisbonne). (voir fig. 8).

Aussi faut-il ajouter que les hématies qu'il a utilisées sont toujours lavées *avant et après* la mise en contact.

Nous avons aussi la preuve que dans certains cas l'anticorps reste fixé sur les hématies profondément.

Fischer fournit une autre preuve inédite : dans un mécanisme d'hémolyse qui, *in vitro*, ne demande pas la présence du complément et, *in vivo*, est certainement plus accentuée du fait de la participation de ce dernier :

On prélève du sang à un donneur O Rh. négatif, on lave ses hématies, comme dans nos expériences précédentes, on en fait deux échantillons, le premier est mis en contact avec du sérum de cheval, chauffé à 56° une heure à l'étuve ou une nuit à la glacière. Le deuxième est mis en contact avec du sérum de lapin anticheval (précipitant et

titrant au 1/10.000) dans les mêmes conditions (les hématies sont diluées à 5 %, les sérums dilués à $\frac{1}{2}$ ou au 1/10 ; en effet les premiers essais ont nettement montré un phénomène de zone).

Les hématies ainsi traitées sont lavées 4 fois, le liquide surnageant est toujours clair, limpide, sans hémolyse. On mélange les hématies des deux échantillons, on met ce mélange et les témoins à l'étuve à 38° : il y a hémolyse dans le mélange. Aussi est-il démontré que les hématies de même provenance ont chacune adsorbé la protéine et que la réaction des protéines antigènes — anticorps a eu lieu même après le lavage — au point de produire une atteinte des hématies véhicules.

Il est absolument certain que nous reproduisons ici, *in vitro*, un processus tout à fait susceptible de se produire *in vivo*.

Dausset dans son dernier livre (voir bibliographie) dit qu'à un certain moment il y a lieu de laver fortement et longtemps et souvent les hématies pour obtenir l'élution des anticorps pour une réaction de sensibilisation à fixer.

Nous avons repris nos lavages et réalisé 5 lavages de file avec les mêmes résultats apparents, même accentués.

Il faut cependant signaler d'emblée la très grande différence de fixation d'anticorps qu'il y avait entre les faits envisagés lors d'une réaction antigènes-anticorps et le phénomène que nous observons.

Dans le premier cas, on élué à partir des hématies un anticorps qui s'est fixé. Cet anticorps est dirigé contre ces hématies et les antigènes qu'elles représentent.

Dans le phénomène que nous observons, les antigènes fixés sur les hématies seraient des anticorps *normaux* dirigés contre d'autres antigènes des hématies.

Mais ces même anticorps seraient toujours capables d'agir dès que les hématies, qui les véhiculent, seraient en contact avec l'antigène spécifique qui correspond à leur activité.

Ainsi en est-il des hématies O mises en contact avec des hématies A ou B.

Le phénomène que nous observons (hémolyse entre hématies) est fréquent et reproductible.

Le mélange des hématies O d'une personne X mises en contact avec les hématies A d'une personne Z donne toujours de l'hémolyse. Ceci plusieurs mois après le premier essai, chaque fois qu'on remet en présence des hématies de X et de Z on a de l'hémolyse.

Il semble que l'hémolyse n'apparaît qu'entre les groupes du système Landsteiner.

Cette hémolyse n'intéresse que les groupes à anticorps de groupes *spontanés*. Les systèmes Rh et les groupes où seul l'anticorps apparaît après immunisation ne sont pas en cause (s'il n'y a pas d'immunisation acquise).

Pouvons-nous dès lors admettre l'existence de particule d'anticorps *spontanés* fixés intégralement à l'hématie ? Ceci est une explication.

On ne peut évidemment pas faire intervenir la possibilité d'une fixation de substances virales et anticorps viral sur l'hématie. (La reproductibilité à longue échéance suffit déjà par elle-même à réfuter cet argument.)

L'autre explication purement verbale pour l'instant serait d'admettre une incompatibilité directe individuelle et familiale, si on admet une différence individuelle de la substance de groupe elle-même et de polysaccharide qui la compose.

Il ne faut pas oublier que le simple fait de réinjecter à un individu son propre sang à répétition aboutit à créer des auto-anticorps.

On doit admettre qu'*in vivo* les éléments plasmatiques ont une action inhibitrice et que la destruction globulaire n'interviendrait pas dans certains cas bien définis — qui rendront compte de la gravité de certains chocs transfusionnels face à la bénignité de certains autres.

Si on examine la différence des hémolyses obtenues selon les hématies mises en présence, on doit penser à la possibilité d'une différence individuelle plus ou moins marquée selon que l'hématie est homo ou hétérozygote et ceci n'est pas exclu même si on admet que l'hémolyse est le fait d'anticorps fixés.

Ce problème posé sera étudié au Centre de transfusion où nous pouvons tester une série d'individus dont nous savons qu'ils sont homo ou hétérozygotes.

Nous pouvons seulement conclure en espérant avoir démontré qu'en dehors des causes d'erreur, il y a interaction directe ou hémolyse *in vitro*.

Quand on met en présence les hématies de groupes différents de Landsteiner, en dehors des mécanismes d'hémolyse déjà connus, le déterminisme du phénomène est étudié. Cette étude n'aboutit, selon toute vraisemblance, qu'à admettre la présence d'anticorps spontanés antigroupe faisant partie intégrante de la cellule (ce qui nous amène à la conception d'*anticorps intracellulaire*) ou à une interaction directe des substances de groupe fixées sur l'hématie, interaction qui sera plus ou moins marquée selon l'hétérozygotie ou homozygotie des hématies envisagées.

Les résultats de certains mélanges que nous avons faits

<i>Dates</i>	<i>Groupes mis en présence</i>	<i>Résultats</i>
9.2.55	A x B	H +
9.2.55	A x B	H +
9.2.55	A x B	H +
9.2.55	A x B	H +
9.2.55	A x B	H +
22.5.56	A x A	H +
22.5.56	A x O	H +
22.5.56	A x O	H +
22.5.56	A x A x O	H +
25.5.56	A x B	H +
28.5.56	B x O	H +
29.5.56	O x A.1 B	H +
29.5.56	O x A.2 B	H +
29.5.56	A.1B x A.2B	H +
30.5.56	A x A	H +
30.5.56	A x A	H +
30.5.56	A x A	H +
30.5.56	A x A x A x A	H +
30.5.56	O x A	H +
30.5.56	O x A	H +
30.5.56	O x A	H +
30.5.56	O x A x A x A	H +
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O	H —
6.6.56	O x O x O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —

<i>Dates</i>	<i>Groupes mis en présence</i>	<i>Résultats</i>
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O	H —
7.6.56	O x O x O x O x O	H —
7.6.56	A x A	H +
7.6.56	A x A	H —
7.6.56	A x A	H +
7.6.56	A x A	H +
7.6.56	A x A	H +
7.6.56	A x A	H +
7.6.56	A x A x A x A x A	H +
7.6.56	O x O x O x B	H +
7.6.56	A x A x A x B	H +
7.6.56	O x O x O x A x A x A	H +
9.8.56	A.1 (C) x A.1 (E)	H —
9.8.56	A.1 (C) x A.1 (d.c.e)	H —
9.8.56	A.1 (E) x A.1 (d.c.e)	H —
9.8.56	A.1 (E) x A.1 (C) x A.1 (d.c.e.)	H —
13.8.56	A x B	H +
31.8.56	A x B	H +
3.9.56	A x B	H +

H + = hémolyse obtenue

H — = absence d'hémolyse

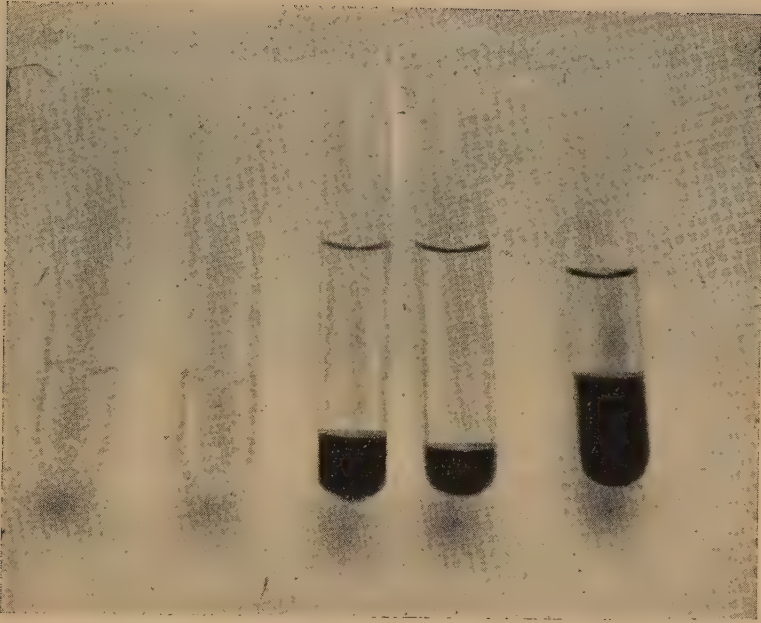


Fig. 1

Mélange du sang A et du sang B

- Tube 1 : prélèvement du liquide de 3e lavage du sang A.
- Tube 2 : prélèvement du liquide de 3e lavage du sang B.
- Tube 3 : une partie des hématies A avec leur liquide de 3e lavage
- Tube 4 : une partie des hématies B avec leur liquide de 3e lavage
- Tube 5 : mélange des hématies trois fois lavées des sangs A et B

(voir l'explication des figures dans le texte)

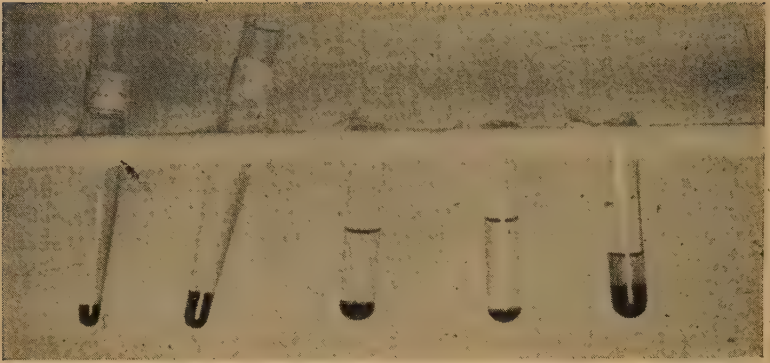


Fig. 2

Mélange du sang A et du sang B

Tube 1 : prélèvement du liquide de 3e lavage du sang A.

Tube 2 : prélèvement du liquide de 3e lavage du sang B.

Tube 3 : mise en contact du liquide de 3e lavage du sang A avec
des hématies trois fois lavées du sang B.

Tube 4 : mise en contact de liquide de 3e lavage du sang B avec des
hématies trois fois lavées du sang A.

Tube 5 : mélange des hématies trois fois lavées des sangs A et B.

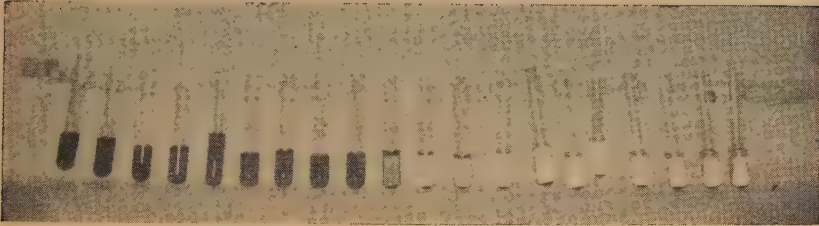
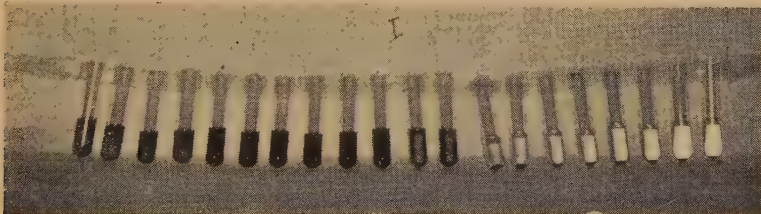


Fig 3

Epreuve de la résistance globulaire

En haut : 20 tubes contenant du sérum physiologique d'une concentration croissante (en partant de gauche à droite) avec dans chacune une goutte du sang pas encore lavé.

En bas : 20 autres tubes contenant respectivement les mêmes solutions à concentration croissante avec, cette fois, une goutte du sang trois fois lavé.



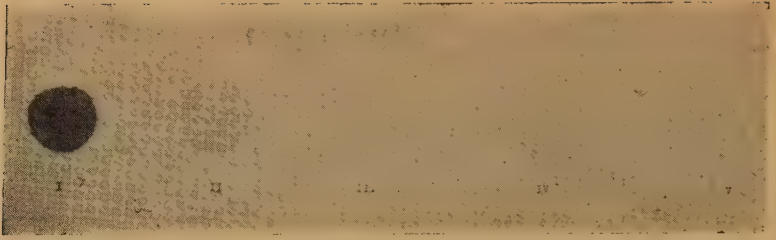


Fig. 4

- I — Une goutte du plasma déposé sur papier
- II — Une goutte du liquide de 1er lavage
- III — Une goutte du liquide de 2e lavage
- IV — Une goutte du liquide de 3e lavage
- V — Une goutte du sérum physiologique témoin

Coloration au « bleu de bromo-phénol » les contours des gouttes IV et V ont été indiqués par des pointillés.

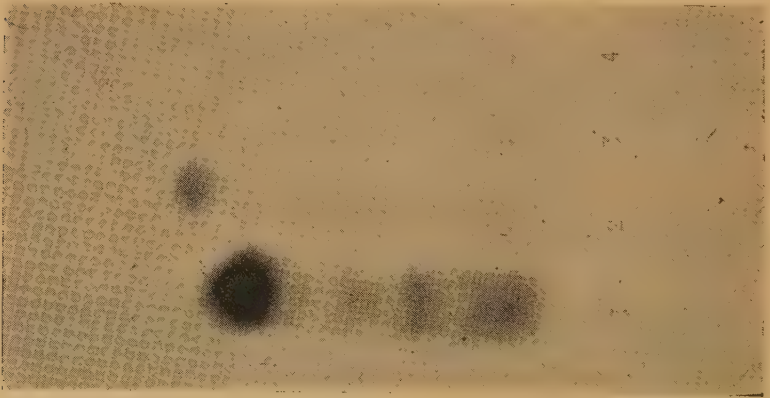


Fig. 5

*Electrophorèse et coloration au « bleu de bromo-phénol »
des liquides des différents lavages :*

- 1 — Une goutte du plasma de sang en question
- 2 — Une goutte du liquide de 1er lavage
- 3 — Une goutte du liquide de 2e lavage
- 4 — Une goutte du liquide de 3e lavage

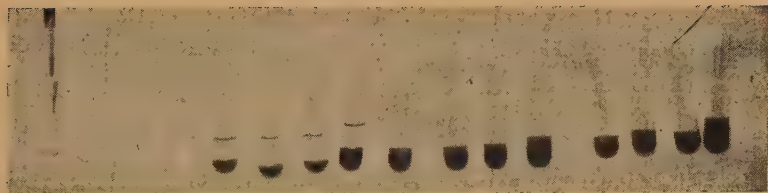


Fig. 6

Mélange de sang O et de divers sangs A (de trois personnes différentes)

Les trois groupes A sont appelés ici A.I — A.II — A.III

Tube 1 : liquide de 3e lavage du sang O

Tube 2 : liquide de 3e lavage du sang A.I

Tube 3 : liquide de 3e lavage du sang A.II

Tube 4 : liquide de 3e lavage du sang A.III

Tube 5 : sang O avec son liquide de 3e lavage

Tube 6 : sang A.I avec son liquide de 3e lavage

Tube 7 : sang A.II avec son liquide de 3e lavage

Tube 8 : sang A.III avec son liquide de 3e lavage

Tube 9 : mélange du sang A.I avec du sang A.II

Tube 10 : mélange du sang A.I avec du sang A.III

Tube 11 : mélange du sang A.II avec du sang A.III

Tube 12 : mélange du sang A.I + A.II + A.III

Tube 13 : mélange du sang O avec du sang A.I

Tube 14 : mélange du sang O avec du sang A.II

Tube 15 : mélange du sang O avec du sang A.III

Tube 16 : mélange du sang O + A.I + A.II + A.III

En déterminant les sous-groupes de ces trois groupes A par du sérum anti-A. nous avons trouvé que le sang A.I appartenait au sous-groupe A.1 et les sangs A.II et A.III appartenait au sous-groupe A.2.

Nous attribuons l'hémolyse produite entre A.II et A.III, (tube 11) qui appartiennent pourtant au même sous-groupe, à une hétérozygotie de l'une ou des deux de ces personnes

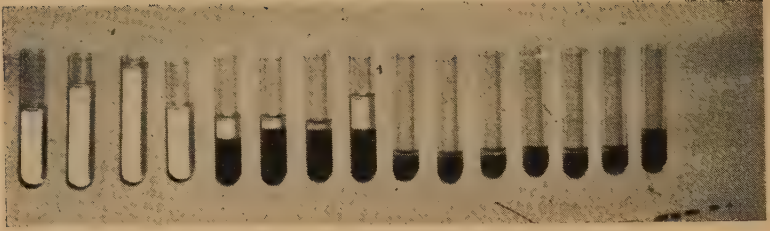


Fig. 7

*Mélange des sangs de 4 personnes différentes ayant le groupe O
(que nous appellerons O.I — O.II — O.III et O.IV)*

Les tubes sont numérotés de gauche à droite.

Tube 1 : le liquide de 3^e lavage du O.I

Tube 2 : le liquide de 3^e lavage du O.II

Tube 3 : le liquide de 3^e lavage du O.III

Tube 4 : le liquide de 3^e lavage du O.IV

Tube 5 : les hématies O.I avec leur liquide de 3^e lavage

Tube 6 : les hématies O.II avec leur liquide de 3^e lavage

Tube 7 : les hématies O.III avec leur liquide de 3^e lavage

Tube 8 : les hématies O.IV avec leur liquide de 3^e lavage

Tube 9 : hématies O.I + hématies O.II (toujours trois fois lavées)

Tube 10 : hématies O.I + hématies O.III (toujours 3 fois lavées)

Tube 11 : hématies O.I + hématies O.IV (toujours 3 fois lavées)

Tube 12 : hématies O.II + hématies O.III (toujours 3 fois lavées)

Tube 13 : hématies O.II + hématies O.IV (toujours 3 fois lavées)

Tube 14 : hématies O.III + hématies O.IV (toujours 3 fois lavées)

Tube 15 : hématies O.I + O.II + O.III + O.IV (toujours trois fois lavées)

	Agglutin.	Hémolyse	Aspect		Agglutin.	Hémolyse	Aspect
SR ₁ + SD + GRR ₁	-	-	bon	SR ₂ + SD + GRR ₂	+	-	très abimés
SR ₁ + SD + GRD	-	-	bon	SR ₂ + SD + GRD	+	-	douteux
SR ₁ + GRD	-	-	bon	SR ₂ + GRD	-	-	bon
SR ₁ + GRR ₁	-	-	bon	SR ₂ + GRR ₂	-	-	bon
SD + GRD	-	-	bon	SD + GRD	-	-	bon
SD + GRR ₁	-	-	bon	SD + GRR ₂	-	+	abimés

SD = Sérum du Donneur

SR₁ = Sérum du Receveur avant l'injection d'anti-tétanique

SR₂ = Sérum du Receveur après l'injection d'anti-tétanique

GRD = Globules rouges du Donneur

GRR₁ = Globules rouges du Receveur avant l'injection d'anti-tétanique

GRR₂ = Globules rouges du Receveur après l'injection d'anti-tétanique

SÉRUM DE CHEVAL

	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000	
SA	++	++	++	+	+	
SA II	++	++	+	+	-	hémolyse forte
SA B	++	++	++	++	+	pas d'hémolyse
SA B II	++	++	++	++	-	pas d'hémolyse

SA = S.anti-cheval adsorbé par des G.R.O d'un individu n'ayant jamais reçu du sérum de cheval. (Les G.R.O sont lavés 3 fois).

SA II = SA adsorbé par les globules G.R.II

SA B = SA " " " " G.R.B

SA B II = SA " " " " G.R.B II

SB = Sérum d'un individu ayant reçu de l'anti-T deux mois auparavant.

G.R.II = globules rouges 48 heures après l'injection de sérum anti-T.

G.R.B = G.R.II ayant été en contact avec SB proportion 1/1,1 h. à 37°

G.R.B II = G.R.II " " " " SB " 3/1, " "

Fig. 8

Voir l'explication page 18

BIBLIOGRAPHIE

1. — BESSIS (M).
Traité de cytologie sanguine, Masson, Paris 1954.
2. — BROCC-ROUSSEAU (D)
& ROUSSEL (G).
Le sérum normal. Récolte, caractères physiques. Masson, Paris 1934.
3. — CINQUIEME CONGRES INTERNATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE. Paris, Edition septembre 1955.
4. — DAUSSET (J).
Immuno-Hématologie Biologique et Clinique. Editions Médicales Flammarion, Paris 1956.
5. — GEIGY (J. R.).
Colorants pour microscopie, Bâle 1953.
6. — HOUSSAY (Bernardo A)
et coll.
Physiologie humaine, en 2 volumes. Traduction française de Claude Laroche. Editions Médicales Flammarion, Paris 1950.
7. — MACHEBŒUF (M)
et coll.
Microélectrophorèse sur papier. Expansion scientifique, Paris 1954.
Microélectrophorèse sur papier, 1^{er} supplément. Expansion scientifique, Paris 1955.
9. — RAPPORTS ET COMMUNICATIONS DU IV^{me} CONGRES INTERNATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE A LISBONNE.
L'Expansion scientifique française, 1951.
10. — RAPPORTS PRESENTES AUX JOURNEES MEDITERRANEENNES DE TRANSFUSION SANGUINE ET DE RECHERCHES HEMATOLOGIQUES, NICE, CANNES, SAN REMO, les 11, 12 et 13 mai 1951.

